

17/9/1

DIALOG(R)File 351:Derwent WPI
(c) 2004 Thomson Derwent. All rts. reserv.

003434667

WPI Acc No: 1982-00773E/198201

Coenzyme-Q(10) prodn. by culturing yeast - in co-presence of electron transmission complex (III) in living body oxidn. process

Patent Assignee: SEKISUI CHEM IND CO LTD (SEKI)

Number of Countries: 001 Number of Patents: 002

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
JP 56154996	A	19811130	JP 8059286	A	19800502	198201 B
JP 88036754	B	19880721				198833

Priority Applications (No Type Date): JP 8059286 A 19800502

Patent Details:

Patent No	Kind	Lan	Pg	Main IPC	Filing Notes
JP 56154996	A		5		

Abstract (Basic): JP 56154996 A

Coenzyme Q10 may be produced by culturing yeast contg. coenzyme Q10

in the copresence of electron transmission complex III in oxidn. process in living body or electron transmission-inhibiting agent to electron transmission complex IV and taking out coenzyme Q10 from the

yeast body. Culturing maybe carried out in the copresence of sodium azide, KCN, CO, or sodium sulphide. Coenzyme Q plays an important roll

as necessary component in terminal electron transmission system.

Coenzyme Q is 2,3-dimethoxy-5-methyl-1,4-benzoquinone with isoprenoid

side chain at 6-position. According to number of isoprenoid gp. on side

chain, various homologues are known. Coenzyme Q10 (CoQ10) has excellent

pharmacological action and physiological action to various diseases.

Yeasts used are e.g. Candida, torulopsis, Rhodotorula, Cryptococcus, Rhodosporidium, Schizosaccharomyces, Japhrina and Leucosporidium genus, etc.

Title Terms: COENZYME-Q; PRODUCE; CULTURE; YEAST; CO; PRESENCE; ELECTRON;

TRANSMISSION; COMPLEX; LIVE; BODY; OXIDATION; PROCESS

Derwent Class: B05; D16

International Patent Class (Additional): C12P-007/66; C12R-001/64

File Segment: CPI

Manual Codes (CPI/A-N): B04-B02C1; D05-C03; D05-H01

Chemical Fragment Codes (M2):

01 G018 G100 H5 H542 H7 H723 H8 K0 L9 L951 M210 M211 M226 M232 M240
M272 M282 M320 M414 M510 M520 M531 M540 M720 M903 N132 N421 N512
N513 Q233 V0 V801

Derwent Registry Numbers: 1175-S; 1423-S; 1518-S; 2052-S

?

⑫ 公開特許公報 (A)

昭56—154996

⑤ Int. Cl.³
C 12 P 7/66
// (C 12 P 7/66
C 12 R 1/645)

識別記号

庁内整理番号
6760—4B

⑬ 公開 昭和56年(1981)11月30日

発明の数 1
審査請求 未請求

(全 5 頁)

⑭ 補酵素 Q₁₀ の製造方法

⑮ 特 願 昭55—59286

⑯ 出 願 昭55(1980)5月2日

⑰ 発 明 者 城座論

茨木市水尾4丁目2番26号

⑱ 発 明 者 阪田展次

吹田市藤白台2丁目28番2号

⑲ 発 明 者 森鎌保昌

大阪府三島郡島本町若山台2丁目2番24号—303

⑳ 発 明 者 太田順造

滋賀県栗太郡栗東町辻388番地

㉑ 出 願 人 積水化学工業株式会社

大阪市北区西天満2丁目4番4号

明 細 書

1. 発明の名称

補酵素 Q₁₀ の製造方法

2. 特許請求の範囲

(1) 補酵素 Q₁₀ を含有する酵母菌を、生体内酸化過程における電子伝達複合体Ⅲ又は電子伝達複合体Ⅳに対する電子伝達阻害剤の共存下に培養し、この菌体より補酵素 Q₁₀ を採取することを特徴とする補酵素 Q₁₀ の製造方法。

(2) 補酵素 Q₁₀ を含有する酵母菌をアンチマイシン A₁、アンチマイシン A₃、n-ヘプチルヒドロキシキノリン-N-オキシド又は2,3-ジメチルカプトプロパノールの共存下に培養することを特徴とする特許請求の範囲第1項記載の補酵素 Q₁₀ の製造方法。

(3) 補酵素 Q₁₀ を含有する酵母菌をアジ化ナトリウム、シアン化カリウム、一酸化炭素又は硫化ナトリウムの共存下に培養することを特徴とする特許請求の範囲第1項記載の補酵素 Q₁₀ の製造方法。

3. 発明の詳細な説明

本発明は補酵素 Q₁₀ の製造方法に関する。

補酵素 Q は、高等動物から微生物に至るまで動植物に広く分布し、既に知られているように、生物の末端電子伝達系の必須成分として重要な役割を果たしている。構造的には6位にイソプレノイド側鎖を有する2,3-ジメチル-5-メチル-1,4-ベンゾキノンであつて、側鎖のイソプレノイド基の数によつて補酵素 Q₀ から Q₁₀ まで各種の同族体が知られている。これらのなかで補酵素 Q₁₀ (以下、CoQ₁₀ と称する。) は、各種疾病に対してすぐれた薬理作用、生理作用を有することが明らかに becoming つれて、医薬品としての需要が増大しつつある。

この CoQ₁₀ を得る方法としては、例えばソラネソール等を出発原料として合成する方法も知られているが、多段階の反応を要すると共に、収率が低く、さらに純粋に分離することが困難であるため、工業的に CoQ₁₀ を得るには不適當である。また、動植物組織から抽出する方法も知られている。

が、資源が限られていること、出操作が煩雑なこともあつて、やはり工業的には適しない。そのために、菌体内に CoQ_{10} を含有乃至生産する微生物が CoQ_{10} の供給源として着目され、既に種々の方法が提案されているが、 CoQ_{10} が呼吸酵素の一つであるところから、菌体の CoQ_{10} 含有量は一般的には極めて小さく、その分離、精製は必ずしも容易でない。

そこで、本発明者らは、培養液よりの分離の容易さ、菌の無害性等から酵母菌に供給源を求め、単位菌体量当りの CoQ_{10} の含有量を増大させる条件を広範囲にわたつて鋭意研究した結果、酵母菌の生育培地に、生体内酸化過程における電子伝達複合体Ⅲ又はⅣに対する電子伝達阻害剤を添加したとき、酵母菌における CoQ_{10} の含有量が高められることを見出して、本発明に至つたものである。

従つて、本発明による CoQ_{10} の製造方法は、 CoQ_{10} を含有する酵母菌を上記電子伝達阻害剤の共存下に培養し、この菌体より CoQ_{10} を採取することを特徴とするものである。

(3)

がいずれも CoQ_{10} 以後の電子伝達を阻害するので、呼吸鎖に分岐が発生し、この結果として分岐点以前の成分が増量したのであろう。

本発明において用いる酵母菌は、 CoQ_{10} の生産能を有する限りは特に限定されないが、例えば、キャンディダ(*Candida*)属、トルロブシス(*Torulopsis*)属、ロドトルラ(*Rhodotorula*)属、クリプトコッカス(*Cryptococcus*)属、ロドスポリジウム(*Rhodospiridium*)属、シゾサツカロマイセス(*Schizosaccharomyces*)属、ジャフリナ(*Japhrina*)属、ロイコスポリジウム(*Leucosporidium*)属等に属するものである。

培地は汎用のものでよく、通常、炭素源及びエネルギー源としてグルコース等の炭水化物や炭化水素、窒素源として硫酸、塩安等のアンモニウム塩、コーンステープリカ、酵母エキス等の有機窒素化合物を適宜に使用し、このほかカリウム塩、ナトリウム塩、マグネシウム塩、リン酸塩、硫酸塩等の金属塩類を適宜に併用する。

培養は通常の条件下で行なえばよく、例えば、

(5)

既に知られているように、電子伝達複合体Ⅲとは、ミトコンドリア内膜中に電子伝達系成分が複合体として存在する四種の一つで、 CoQ_{10} よりチトクロムCまでの電子伝達に関与し、この電子伝達を阻害するものがこの複合体に対する電子伝達阻害剤である。具体的にはアンチマイシン A_1 、 A_3 、 n -ヘプチルヒドロキシキノリン-N-オキシド、2,3-ジメルカプトプロパノール等が挙げられる。また、同様に、電子伝達複合体ⅣはチトクロムCより酸素までの電子伝達に関与し、その阻害剤の具体例としてアジ化ナトリウム、シアニ化カリウム、一酸化炭素、硫化ナトリウム等が挙げられる。電子伝達阻害剤については、例えば、「生化学実験講座第12巻エネルギー代謝と生体酸化(上)」第249頁(日本生化学会編、朝東京化学同人発行(1976年)等に説明されている。本発明において、このような電子伝達複合体Ⅲ又はⅣに対する電子伝達阻害剤の共存下に酵母菌を培養して菌体中の CoQ_{10} の含有量を高め得たのは、理由は必ずしも明らかではないが、これら阻害剤

(4)

pHが1~6、温度が25~35℃、溶存酸素濃度が10 ppm以下の条件で、通気攪拌又は振とう培養により行なう。

本発明において培地への阻害剤の添加方法、添加時期等は特に制限されず、例えば、培養開始時又は培養中途において一度に添加してもよく、また、菌の生育状況に応じて適宜の回数に分けて添加してもよい。阻害剤の添加量も特に制限されるものではないが、通常は培養液1ℓ当りについて 10^{-10} ~ 10^{-2} モルが適する。

このようにして電子伝達阻害剤の共存下に酵母菌を培養した後、菌体より CoQ_{10} を分離、精製するには、常法による。例えば、先ず培養液を遠心分離等して菌体を分離し、これをピロガロール共存下にアルコール性アルカリでケン化すると共に CoQ_{10} を抽出する。次に、アルコール抽出液をヘキサンで抽出して CoQ_{10} をヘキサンに溶解し、このヘキサンを蒸発させて CoQ_{10} を得る。この精製は種々の方法によつて行なうことができるが、工業的にはクロマトグラフィーによる精製が有利で

(6)

ある。

以上のように、本発明の方法によれば、電子伝達複合体Ⅲ又はⅣに対する電子伝達阻害剤の存在下に酵母菌を培養して菌体中の CoQ_{10} 含有量を高め得たので、 CoQ_{10} の分離、精製が容易になると共に、高収率で CoQ_{10} を得ることができる。

以下に本発明の実施例を挙げるが、本発明はこれらに限定されるものではない。なお、実施例においては、 CoQ_{10} の同定は標準品とのペーパークロマトグラフィーの比較によつて行ない、また、その定量はクラフエン法によつた。

実施例 1

グルコース 15 g/ℓ、硫酸 0.3 g/ℓ、 K_2HPO_4 3.6 g/ℓ、 Na_2HPO_4 0.9 g/ℓ、 MgSO_4 0.3 g/ℓ、 FeSO_4 0.05 g/ℓ 及び酵母エキス 1.0 g/ℓの組成の培地 (pH 6.0) を加熱殺菌した後、キャンディダ・クルバータ (*Candida curvata*) IFO 0732 を 30 ℃ で 30 時間前培養した。この培養液 1ℓ を上記と同一組成の加熱殺菌した培地 100ℓ に接種すると共に、第 1 表に示す量にて DNP を添加し、500 ℓ 坂

(7)

第 1 表

KCN 添加量 ($\mu\text{mol}/\text{培液} 1 \ell$)	KCN 添加時期 (培養開始後、 添加までの 時間)	乾燥菌体の CoQ_{10} 含有量 (重量%)	生成乾燥 菌体量 (g/培液 1ℓ)
0	—	0.035	6.15
0.05	0	0.050	6.09
0.05	15	0.053	6.18
0.5	0	0.067	3.14
0.5	15	0.064	4.87

第 2 表

Na_2S 添加量 (ミリモル/ 培液 1 ℓ)	Na_2S 添加時期 (培養開始後、 添加までの 時間)	乾燥菌体の CoQ_{10} 含有量 (重量%)	生成乾燥 菌体量 (g/培液 1ℓ)
0	—	0.035	6.15
0.1	15	0.062	6.02
1.0	15	0.064	5.90

(9)

口フラスコ内で 30 時間振とう培養した。

培養終了後、培養液を遠心分離して菌体を分離、乾燥し、乾燥菌体 2g を水 15 ℓ、メタノール 45 ℓ、水酸化ナトリウム 3g 及びピロガロール 0.7g からなる抽出液で 80 ℃、1 時間ケン化抽出した。この抽出液を n-ヘキサン 75 ℓ にて 3 回抽出し、n-ヘキサンを水洗後、減圧留去し、 CoQ_{10} を定量化した。結果を第 1 表に示す。リナロールを添加しない場合も併せて示す。

実施例 2

阻害剤として硫化ナトリウムを用いた以外は実施例 1 と全く同様にして第 2 表に示す結果を得た。

実施例 3

阻害剤としてアンチマイシン A_1 を用いた以外は実施例 1 と全く同様にして第 3 表に示す結果を得た。

実施例 4

ロドトルラ・ムシラギノーサ (*Rhodotorula mucilaginosa*) AHU-3948 を用いた以外は実施例 1 と全く同様にして第 4 表に示す結果を得た。

(8)

第 3 表

アンチマイシン A_1 添加量 ($\mu\text{mol}/\text{培液} 1 \ell$)	アンチマイシン A_1 添加時期 (培養開始後、 添加までの 時間)	乾燥菌体の CoQ_{10} 含有量 (重量%)	生成乾燥 菌体量 (g/培液 1ℓ)
0	—	0.035	6.15
0.005	15	0.059	5.78
0.05	15	0.054	5.03

第 4 表

KCN 添加量 ($\mu\text{mol}/\text{培液} 1 \ell$)	KCN 添加時期 (培養開始後、 添加までの 時間)	乾燥菌体の CoQ_{10} 含有量 (重量%)	生成乾燥 菌体量 (g/培液 1ℓ)
0	—	0.036	6.22
0.05	15	0.062	5.25
0.5	15	0.067	5.09

実施例 5

酵母菌としてクリプトコッカス・ネオフォルマ

手 補 正 書 (自 発)

昭和56年3月3日

特許庁長官殿



ンス (Cryptococcus neo () ns) IFO 1420
を用い、阻害剤として硫化ナトリウムを用いた以
外は実施例1と全く同様にして第5表の結果を得
た。

第 5 表

Na ₂ S添 加量 (ミリモル /培養液 1ℓ)	Na ₂ S添 加時期 (培養開始後、 添加までの 時間)	乾燥菌体の CoQ ₁₀ 含有量 (重量%)	生成乾燥 菌体量 (g/培養液1ℓ)
0	—	0.029	5.98
0.1	15	0.054	5.91
1.0	15	0.049	5.77

特許出願人 積水化学工業株式会社
代表者 藤 沼 基 利

1. 事件の表示

昭和55年 特 許 願 第 59286 号

2. 発明の名称

補酵素 Q₁₀ の製造方法

3. 補正をする者

事件との関係

特許出願人

郵便番号

530

住 所

大阪市北区西天満二丁目4番4号

名 称 (217)

積水化学工業株式会社

代表者 藤 沼 基 利

特許部 TEL 大阪 (06) 365-2181
特許部 東京駐在 TEL 東京 (03) 347-9102

(1)

4. 補正の対象

(1) 明細書の発明の詳細な説明の欄

5. 補正の内容

(1) 明細書第6頁第1行目に、

「25～35℃」とあるを、

「20～40℃」と訂正する。

(2) 明細書第6頁第10行目と第11行目との間に次の文章を挿入する。

「尚、阻害剤の添加量が少ないために、所定量を正確に添加しにくい場合は、該阻害剤を無菌水又はエチルアルコール等に溶解して添加してもよい。」

(3) 明細書第7頁下から第8行目に、

「硫安0.3g/ℓ」とあるを、

「硫安3g/ℓ」と訂正する。

(4) 明細書第7頁下から1行目に、

「DNP」とあるを、

「KCN」と訂正する。

(5) 明細書第8頁第1行目と第2行目との間に次の文章を挿入する。

「尚、KCNの添加は、添加量0.05および0.5μモル/培養液1ℓの場合は各々KCNの3×10⁻⁴および3×10⁻³重量%無菌水溶液にして添加した。」

(6) 明細書第8頁第2行目乃至第3行目に、

「分離、乾燥し、乾燥菌体2gを」とあるを、
「分離し、乾燥菌体2gあたり」と補正する。

(7) 明細書第8頁第5行目に、

「抽出液」とあるを、

「組成液」と補正する。

(9) 明細書第8頁第8行目に、

「リナロール」とあるを、

「KCN」と訂正する。

(10) 明細書第8頁第12行目と第13行目との間に次の文章を挿入する。

「尚、硫化ナトリウムの添加は、該硫化ナトリウムの0.1重量%無菌水溶液にして添加した。」

(11) 明細書第8頁下から第5行目の後に次の文章を挿入する。

「尚、アンチマイシンの[]は、添加量0.005
および0.05 μ モル/培養液1 Lの場合は、各
々アンチマイシンの 3×10^{-4} および 3×10^{-3}
重量%エチルアルコール溶液にして添加した。」

以 上